

STIC-ILL

From:  
Sent:  
To:  
Subject:

Schmidt, Mary  
Thursday, December 12, 2002 1:36 PM  
STIC-ILL  
more references 09/122,588

424039

Slepushkin et al, J Biol. Chem., Jan 24, 1997, 272, 4, p2382-8.  
Brown et al, Current opinion in rheumatology, nov. 1996, vol.8, n. 6, p539-43.  
Konopka et al, biochimica et biophysica acta, jul. 24, 1996, 1312, 3, 186-96.  
sioud, european j. of immunology, may 1996, 26, 5, p1026-31.  
gu et al., circulation research, jul. 1995, 77, 1, p14-20.  
de young et al. biochemistry, 10/11/94, 33, 40, 12127-38.  
snyder et al. blood, jul. 15, 1993, 82, 2, 600-5.  
taylor et al. nucleic acids research, 9-11-92, 20, 17, 4559-65.  
rossi et al., aids research and human retroviruses, 2-92, 8, 2, 183-9.  
sioud et al., journal of molecular biology, feb. 20, 1992, 223 (4), 831-5.  
lasic dd, abstracts of papers american chemical society 213, 1-3, pbiot 1, 1997.  
schuster et al., drugs of today 32, 8, 653-661, 1996.  
sokol et al, critical reviews in eukaryotic gene expressio n6, 1, 29-57, 1996.  
malone, journal of cellular biochemistry supplement 0, 19a, p206, 1995.  
sullivan, methods (orlando), 5, 1, 61-66, 1993.

satoshi et al., report of the fermentation research institute (Yatabe) 0, 75, p69-85, 1992.

sullivan et al, journal of cellular biochemistry supplement 0, 17 part e, p23, 1993.

shaji et al., antiviral research 20, suppl. 1, p165, 1993.

thanks,  
Melissa  
11d05  
mailboxes 11e12  
AU 1635

Scientific and Technical  
Information Center  
REC'D  
PAT. & T.M. OFFICE

0368 5345

9047790

# 種々のリボザイムの構築とそれらの反応について

西川 諭, 多比良和誠

[平成4年9月30日受理]

## 1. はじめに

従来、すべての酵素はタンパク質から構成されていると確信されていたが、1981年に酵素活性を持つRNA分子(リボザイム)が発見され、それまでの酵素に対する概念は打ち破られた。この画期的発見はコロラド大学のCechらによってもたらされ、原生動物のテトラヒメナのリボゾーマルRNA(rRNA)前駆体がタンパク質の力を借りずに、機能上不必要なイントロンを $Mg^{2+}$ イオン存在下にセルフスプライシングにより取り除くことを証明した<sup>1)</sup>。その後、リン酸ジエステル結合を自己切断するような触媒機能を持つRNA分子が次々と発見されてきた。このような中で、コロラド大学のUhlenbeckら<sup>2)</sup>ならびにCSIRO(オーストラリア)のHaseloffら<sup>3)</sup>はそれぞれ別個に、植物のウイロイドやウイルス、さらにイモリのサテライトRNAに見いだされたリボザイムの間で保存されている塩基配列に着目し、わずか20~30ヌクレオチドで触媒活性部位を構成する人工リボザイム(ハンマーヘッド型リボザイム、図1)の構築に成功した。このハンマーヘッド型リボザイムは、基質となるRNA分子の塩基配列を認識して塩基対を形成する結合部位と、 $Mg^{2+}$ イオンをコファクターとして基質RNA鎖を切断する触媒ループ部位からなり、基質RNAのGUX(X=C, U, A)の3'側でリン酸ジエステル結合を切断する。同じ核酸でありながらDNAには見られない機能を持つRNAがどのようにして働くのか、どのような構造が必要なのかは科学的にも興味深く、また結合部位の塩基配列を変え特定のmRNAやウイルスRNAを切断(不活性化)したり、遺伝子の発現を制御する方法としても注目されている<sup>4)</sup>。

## 2. リボザイムを利用したRNAのトリミング

ハンマーヘッド型リボザイムはもともと植物のウイロイドやウイルスRNAが複製する際に、1ユニットごとに切り離すのが役目であった。最近では、その触媒作用をトランスに使い、特定のRNAを切断する方法として期待が高まっている。ここではまず本来のシスの働き(自己切断活性)を利用したRNA発現系について紹介しよう<sup>4-8)</sup>。

RNAウイルスの研究上、試験管内で生物学的活性のあるウイルスRNAを合成することが重要な課題となっている。その際、合成されたRNAウイルスの5'および3'末端に、本来ウイルスRNAが持っていない余分な配列が付加されると、ウイルスの感染能が失われてしまうことがある。そこで5'、3'両末端にシスに働くリボザイムを配置し、RNAポリメラーゼによる転写で常に一定の長さのRNAができるシステムを考案した(図2)。従来のラン・オフ法では数塩基ずれたRNA転写産物がしばしば得られ、NMRやX線結晶解析のサンプル調製法としては最適ではなかった。しかし、このベクターを用いると両末端におけるずれは全くなく、特に均一の短いRNA転写産物を調製する方法として優れている。さらに後述するように、ユニットをタンデムに繰り返す時にも利用できる。このベクターを用いてトランスに働くリボザイム(SFL1用リボザイムの鋳型DNAが図2のDNA Template領域に挿入してある、図3B)を作製した例を述べる。

環状プラスミドと対照としてラン・オフ転写用にHindIIIで切断した直鎖状DNAを用い、経時的に反応を観察した(図3A)。ここで、それぞれのバンドは下記のRNA転写および転写後の切断産物を表す。

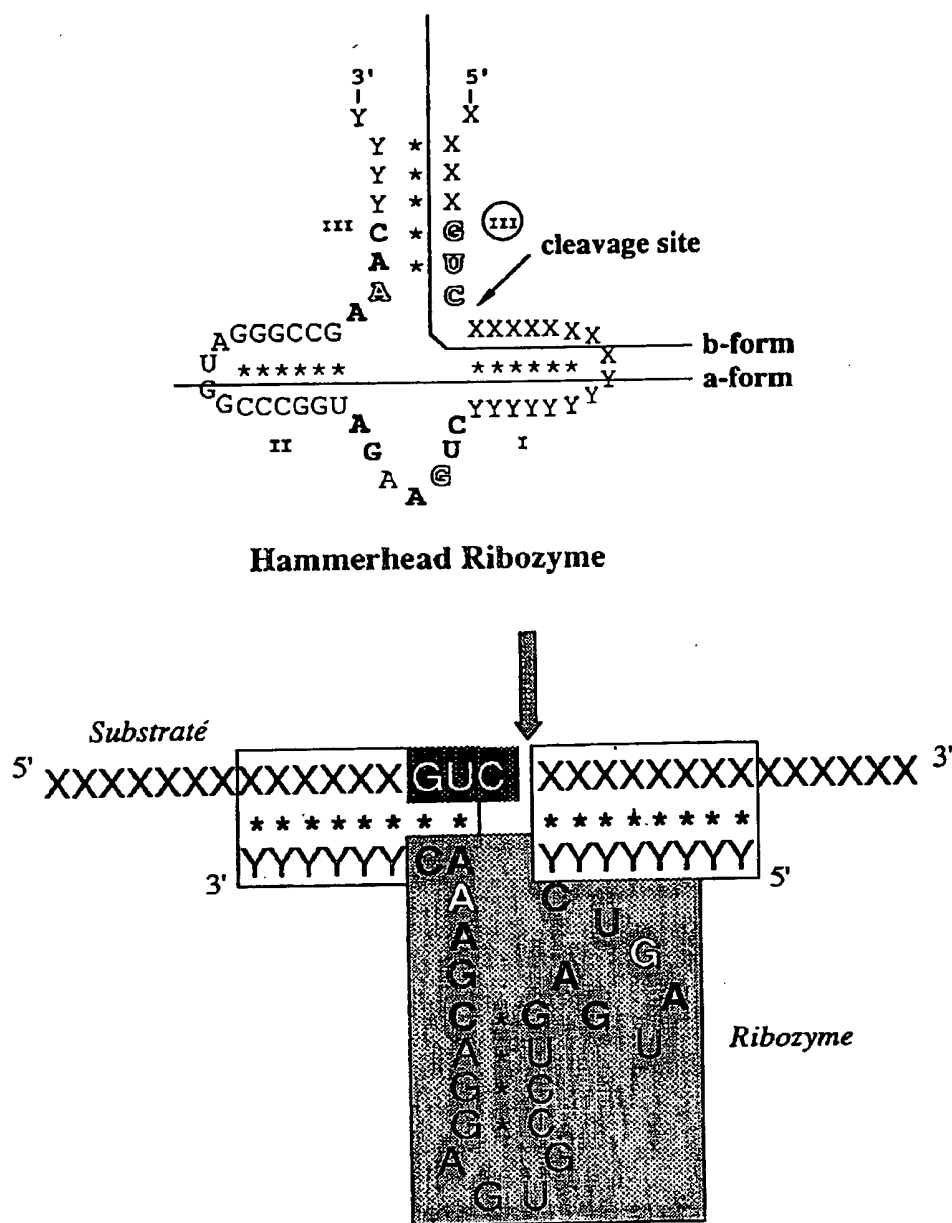


図1 ハンマーヘッド型リボザイム(切断部位近傍の2次構造が金槌の頭をしている:上図)。  
下図は上図のb-formの位置で2分子に分割し、リボザイムが分子間でも作用できるように  
エンジニアリングしたもの。

- バンド1; ラン・オフ転写産物(5'トリミングリボザイム+SFL1用リボザイム+3'トリミングリボザイム, 全長173塩基)。  
バンド2; 3'トリミングリボザイム+SFL1用リボザイム(120塩基)。  
バンド3; 5'トリミングリボザイム+SFL1用リボザイム(114塩基)。  
バンド4; SFL1用リボザイム(61塩基)。

## pGENE8459 Series

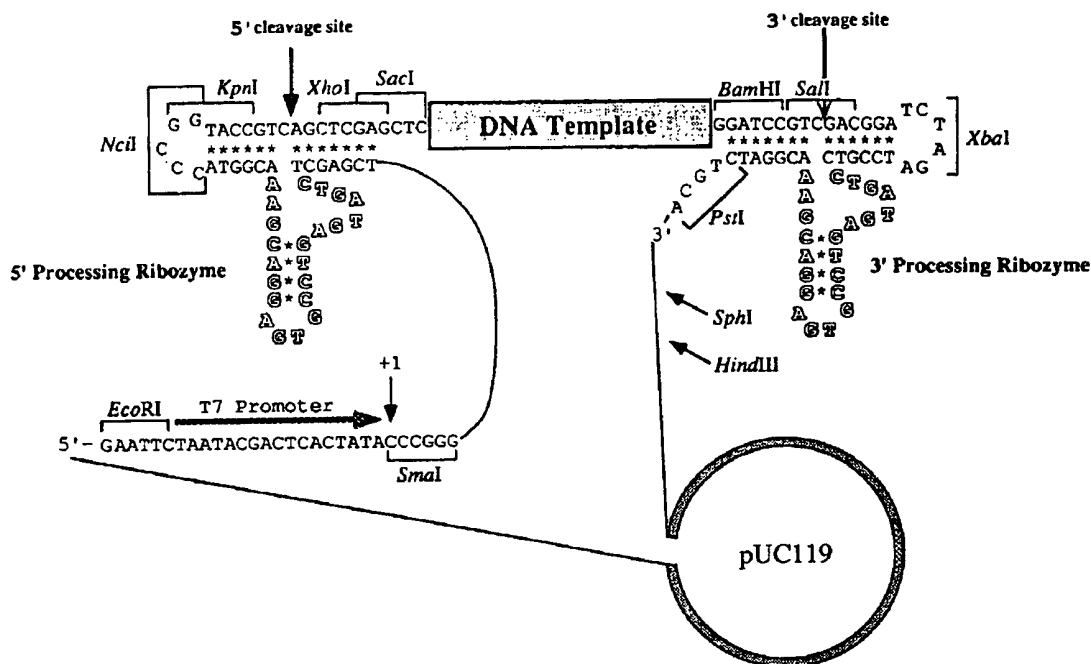


図2 鋳型DNA (DNA template) 由来のRNA転写産物の5', 3'をトリミングする発見ベクター

バンド5; 3'トリミングリボザイム(59塩基)。

バンド6; 5'トリミングリボザイム(53塩基)。

ここで注目すべきことは、目的のSFL1用リボザイムの転写量が環状DNAを鋳型にしたほうが、線状DNAの時よりも10倍以上も多いことである(バンド4の比較)。この理由は環状DNAが鋳型の場合、T7RNAポリメラーゼが鋳型DNAから外れることなく、ローリングサークル機構で反応が続くためと考えられる。この結果生ずる、原点付近に見えるプラスミドDNA由来の転写産物を減らすべく、現在ではターミネーターを3'トリミングリボザイムの下流に挿入した改良型も作り、さらに転写量を倍加させることに成功している<sup>9)</sup>。

前述したように、X線結晶解析のサンプルを調製する際、サンプルの均一性が、実際に結晶化できるかどうか大きく影響する。DNAサンプルの場合、両末端が不均一であるとなかなか結晶化しないことが知られている。RNAサンプルにおいても、同様に、両末端の不均一性が結晶化を妨げると予測されるので、英国医科学研究機構(MRC)の長井らは、図2のトリミングシステムを利用して均一なRNAサンプルを調製している<sup>10)</sup>。また、この転写系の最も大きな特徴は次のセクションで紹介する「ユニットのタンデム化」であり、図2のユニットを例えば5個タンデムに連結したDNA鋳型を用いると、RNA転写産物の生産量は5倍になる。このような「ユニットのタンデム化」によりX線結晶解析用のRNAサンプルの調製を効率良く行うことが出来る。つまり、同じDNA Template(図2)を含むユニットを繰り返すことで、RNA転写産物量を増やすことができる。また、種々の配列をそれぞれのDNA Template領域に挿入し、それらをタンデム化することにより、一度に多種類のRNAを発現する方法としても有効である。このような「ユニットのタンデム化」により多種類のリボザイムやアンチセンス

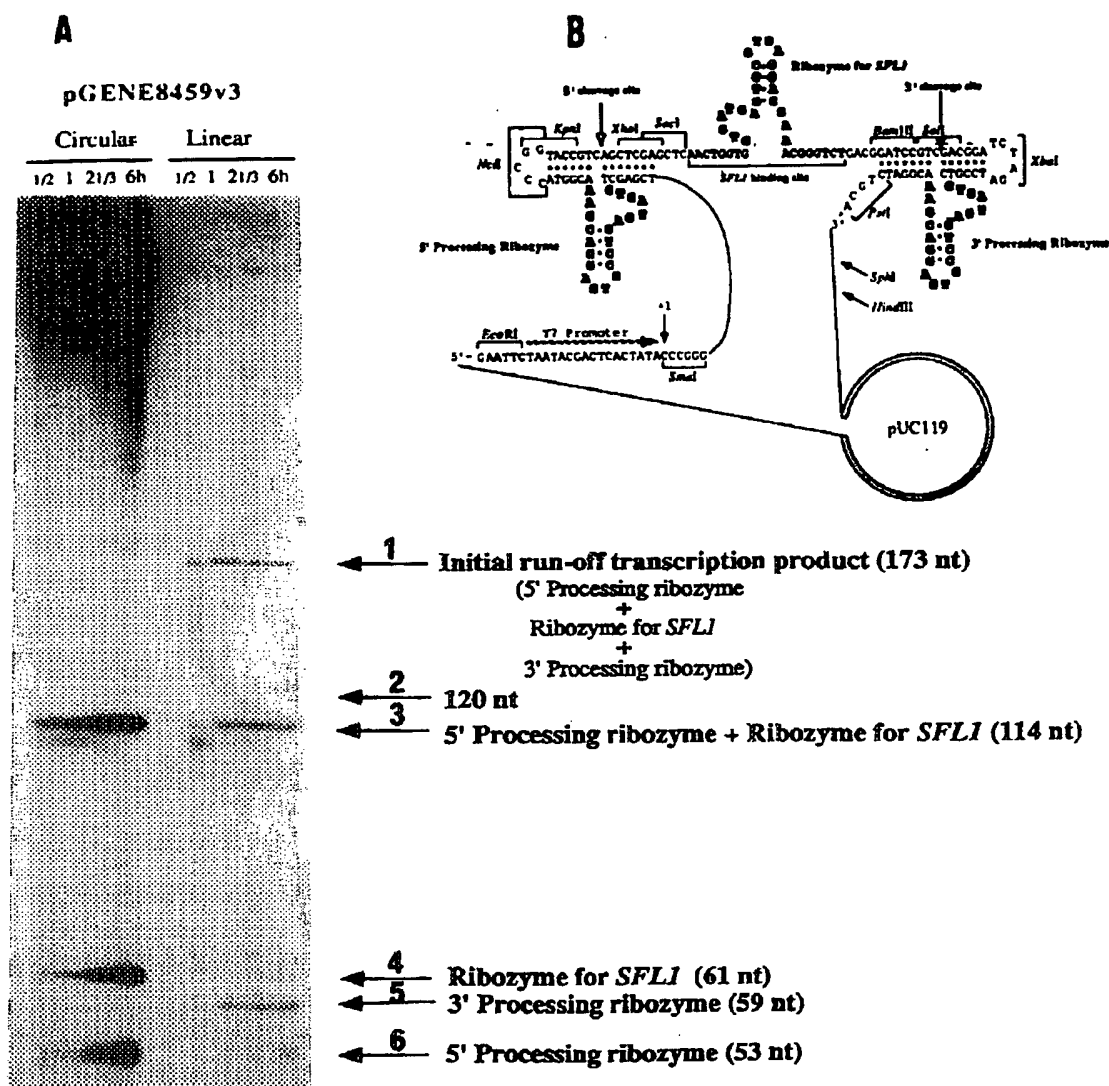


図3 pGENE8459発現ベクター(図2)を用いて転写したRNA産物のポリアクリルアミドゲル電気泳動

RNAを発現させることができる。

トリミングに利用できるリボザイムには、他にヒトデルタ肝炎型ウイルス由来のリボザイム(HDVリボザイム)がある。このリボザイムのシス活性は高く<sup>11)</sup>、また、切断部位の5'側の配列が1ヌクレオチドでよいので<sup>12)</sup>、特に3'末端に余分な配列を付加したくない場合には有効であろう。

### 3. 散弾銃型リボザイム発現ベクターの開発

宿主の酵素を利用して生きてゆくウイルスを選択的にやっつけるのはなかなか難しい。リボザイムはそのターゲットが遺伝情報の産物のタンパク質でなく、その情報のもとである mRNA あるいは遺伝子 RNA であること、そして基質特異性を自由に設計できることから抗ウイルス薬として非常に期待され

ている。例えば最も期待されているのが、エイズウイルス RNA に対するリボザイムである。エイズウイルスを含む RNA ウイルスによる疾病の悪の根源は RNA であり、リボザイムにより RNA を破壊することができれば、エイズの治療も可能となるであろう。現在エイズ患者に投与されているアジドチミジン(一般に AZT と呼ばれている)は逆転写酵素に対する阻害剤であり、特異性が低いうえに延命効果はあるものの治療薬ではない。それに比べリボザイムは、基本的にはアンチセンス RNA としての標的部位への高い基質特異性と結合能を有している上に(図 1B)、標的部位での RNA 切断活性も持ち合わせている。つまり、リボザイムは狙った箇所でのみ相手を切断するので、悪の根源を取り除くだけでなく、AZT と違い副作用が無い。すでに培養細胞での実験では成功例がある<sup>13)</sup>。ところがエイズウイルスで最も問題になるのが、逆転写酵素の読みが甘く修正機構もないために、ウイルス遺伝子の変異の頻度が高いことである。結果としてウイルスの表面抗原が変化しやすく、効果的なワクチンの開発も困難である。抗エイズ用リボザイムを設計する場合も、この遺伝子の変化にどのように対抗して行くかが問題となる。たとえ、ある特定部位を切断するリボザイムを細胞内で発現させたとしても、RNA 上のターゲット塩基配列に変異が起これば、そのリボザイムは効力を失うからである。しかし、エイズウイルス RNA に変異が起これば、無制限に起これる訳ではない。エイズウイルス RNA がコードしている遺伝情報でも、機能上重要な領域には変異が起これにくい。そこで、比較的变化しにくい箇所(A, B, C, D, ---)を狙って、それぞれに対応するリボザイムを細胞内で発現させ、複数箇所を同時に切断するとよい。そうすれば、狙った箇所の内 1 箇所や 2 箇所が変化しても、どこかの变化していない 1 箇所だけでも切断できればエイズウイルスは死ぬ。また、変異が起これにくい部位(A, B, C, D, ---)全てが、同時に変化する確率は極端に低くなる。

そこで、多数の科学者が変異が起これにくい部位(A, B, C, D, ---)を攻撃するリボザイムを、単純にタンデムにつないだものを作成した(図 4A)。この構築は一見よさそうにも見えるが、よくみると多くの問題を抱えていることに気づく。実は、昨年の 3 月米国コロラド州にてリボザイムに関する国際会議(Keystone Symposium; 以前の UCLA Symposium)が開催された時に、筆者は図 4A のスライドを用いてこの構築が抱えている問題点について触れ、筆者は後述する図 4b の構築を好む理由を説明した<sup>14)</sup>。すると、偶然にも同じ会場で図 4A に相当する構築を行ないその結果を発表した科学者がおり、筆者の予測通り結果はネガティブであった。どうして図 4A の構築に問題があるかという点、このベクターから発現された種々のリボザイムは、一本の長い RNA 鎖上に並んでいるため、例えば A サイトを攻撃するリボザイムがエイズウイルス RNA の A サイトに向かうと、同時に他の B, C, D, ---といったサイトに対するリボザイムもそれに付随するため、独立して複数のサイトを攻撃することができない。そればかりでなく、最も深刻な問題として、図 4A のベクターから転写された長い RNA 分子中には、相同性の高い領域が多数存在している(複数のリボザイム領域)ため、例えばリボザイム A の領域とリボザイム C の領域でハイブリッドを形成し、実際は活性のない RNA 分子ができてしまう。リボザイムの切断活性をハサミに例えると、単純に複数のハサミをつないただけでは、ハサミ同士が絡み合って役に立たなくなる。図 4A の構築には、こういった問題が山積みしていると考え、我々は別の方向からのアプローチをとった<sup>4-9)</sup>。

アイデアとしては、エイズウイルス RNA を切断する複数のハサミの間にそのハサミ間を切断する別の小さなハサミを入れた。こうすると、エイズウイルス用のハサミ同士が絡み合う前に、それぞれのエイズウイルス用のハサミ間を小さなハサミが切断し、切断されたエイズウイルス用のハサミはそれぞれが独立にエイズウイルスを攻撃することができる。図 4B に我々が開発した、シスに(分子内で)働くリボザイムとトランスに(分子間で)働くリボザイムとを組み合わせたベクターを示す。この構築では、複数のリボザイムを含む長い RNA が転写されるが、転写と同時にシスに働くリボザイムによってトラン

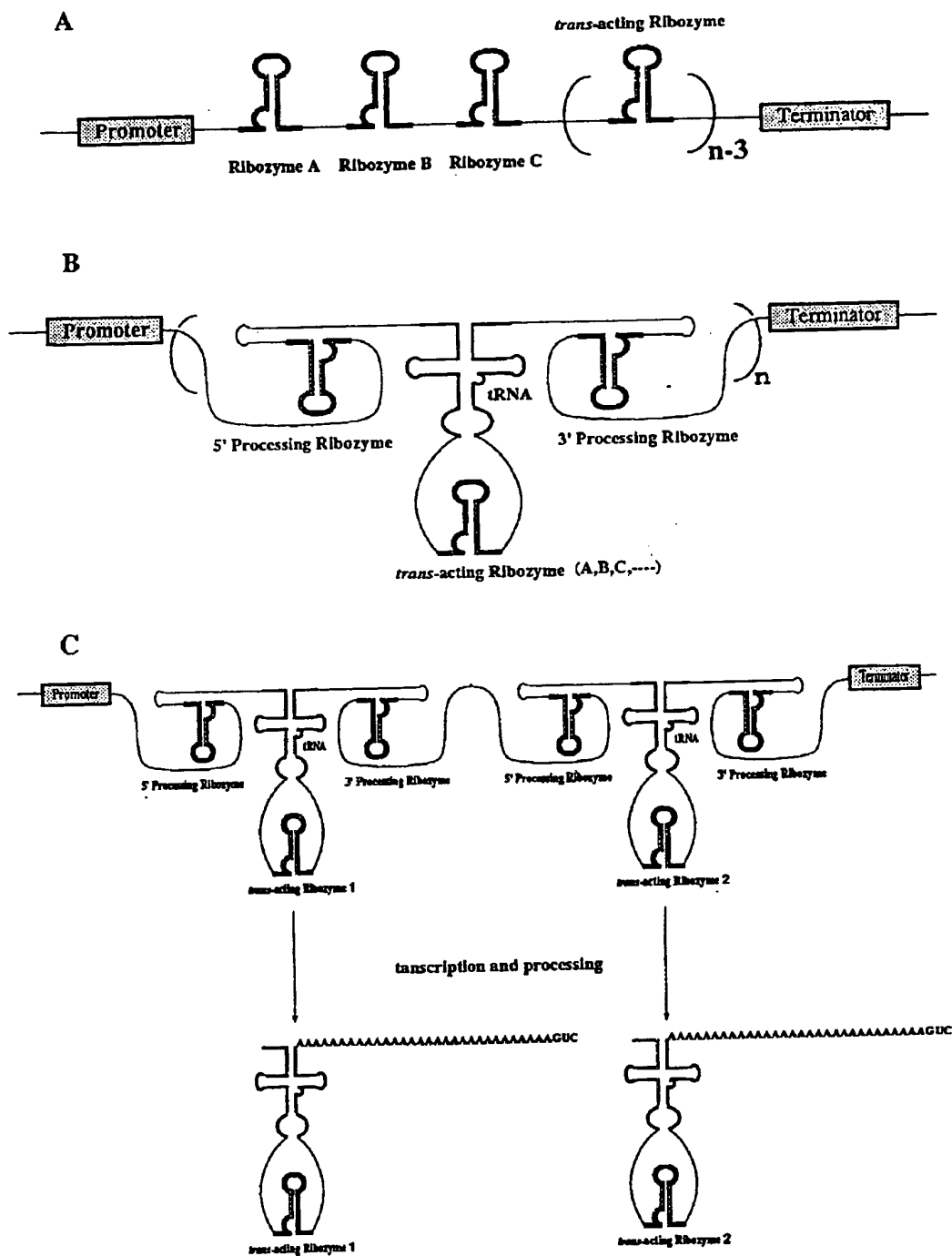


図4 リボザイム発現プラスミドの模式図。A. 種々のリボザイム配列を単純にタンデムにつないだ縦来型。B. 散弾銃型リボザイム発現プラスミド。C. 2個のユニットをつないだ場合(Bで $n=2$ )に転写されたリボザイム。実際は $n>10$ 。

スに働くリボザイムの両端が切断されるので、それぞれのトランスに働くリボザイムは他のリボザイムと独立に機能することができ、それぞれが自分の標的部位でエイズウイルスを切断することが可能となる。さらに、トランスに働くリボザイムの *in vivo* での安定性を高めるために、tRNA のアンチコドンにリボザイムを埋め込んだ形状をとっており、また mRNA の場合と同様にポリ(A)結合蛋白質によるさらなる安定化を期待して、切断後の3'末端にはポリ(A)テールが付加されるように設計してある。実際にこの tRNA に埋め込んだリボザイムのウシ胎児血清中での安定性を見ると10倍近くも上昇していた<sup>8)</sup>。このユニットを複数連結させると多種類の独立したリボザイムを同時に作り出すことができる。2つのユニットを連結させた場合の転写例を図4Cに示す。試験管内ではあるが、複数のトランスに働くリボザイムが設計通りに発現し、それぞれがエイズウイルス RNA を予定した位置でのみ切断することを確認している。

#### 4. キメラリボザイム — 高安定、高特異性、高活性リボザイムの作製 —

リボザイムを抗ウイルス剤として利用する方法としては、前記のようなプラスミド (図2&4) にリボザイム遺伝子をのせ細胞内で発現させる方法と、合成リボザイムを直接、細胞に導入する方法が考えられる。直接導入の場合、生体内のヌクレアーゼにより分解され易い RNA の安定性をいかにして高めるかが大きな問題になる。そこで、リボザイムの触媒ループ領域を除いた部分を RNA より安定な DNA に置き換え、さらにチオリン酸結合にする方法を検討した<sup>15,16)</sup>。

実際には図5に示すように、基質結合部位のみ DNA に変えた DNA/RNA キメラリボザイム、DRD32、さらにリボザイム自身の持つステム・ループを DNA に置換した DRDRD32 を合成した。現在では市販の RNA のアミダイトを DNA 自動合成機に装着し、DNA 合成プログラムを多少変更することで30mer 程度の RNA は化学合成で得ることができる。更に合成途中でチオ化のステップを加えれば、チオ DRDRD32 などのチオリン酸結合を有するリボザイムを合成できる。チオ DRDRD32-3S は触媒ループ領域にもチオリン酸結合を導入したもの、チオ DRDRD32-2SG、チオ DRDRD32-2SA は触媒部位内の特にヌクレアーゼによる切断を受け易い U10 を G あるいは A に置換したものである (図6)。

まず0.1%ウシ胎児血清中での安定性をみると図7のように、ステムをチオ化しただけでは不十分で、もとの R32 と安定性はほとんど変わらなかった。これはウシ胎児血清中には RNase A 様のエンドヌクレアーゼが多いため、触媒部位の特に5'末端から10番目の U の3'側で分解され易いことがわかった (図6)。そこでこのループの一部分をチオ化 (チオ DRDRD32-3S) すると10倍、更に U を A, G に変える (チオ DRDRD32-2SG, チオ DRDRD32-2SA) と100倍も安定性が増した (図7)<sup>16)</sup>。

つぎに活性をみると、触媒部位を修飾していない安定化リボザイム (DRD32, DRDRD32, チオ DRDRD32) の  $K_M$  値は R32 のそれに比べ、約60倍も上昇した。これは基質とリボザイムのヘリックスがより不安定な RNA・DNA になったためと考えられる。実際の応用を考えた場合、 $K_M$  値の上昇は基質との結合領域を長くしたり、また、投与量を増大させることにより克服できるので、あまり問題にならないであろう。むしろリボザイムの  $K_M$  値は一般のタンパク質酵素に比べ非常に小さいので、 $K_M$  値が上がるとミスマッチなハイブリダイズすることが少なくなり、特異性を高めることになるのでかえって好都合である。

一方、 $k_{cat}$  値は DNA とのキメラ化、チオ化により3-5倍上昇した。これはリボザイムの修飾により  $k_{cat}$  値をあげることに成功した世界で初めての例である<sup>15)</sup>。触媒部位内の残基もチオ化したチオ DRDRD32-3S は R32 の12%、チオ DRDRD32-2SG, チオ DRDRD32-2SA は45%の切断活性を有していた。これらの修飾によりなぜ活性が上昇するのかは興味深いところで、リボザイムの切断反応を詳細に調べる上でも格好のモデルとなっている。リボザイム活性には、2価のマグネシウム・イオンが不可



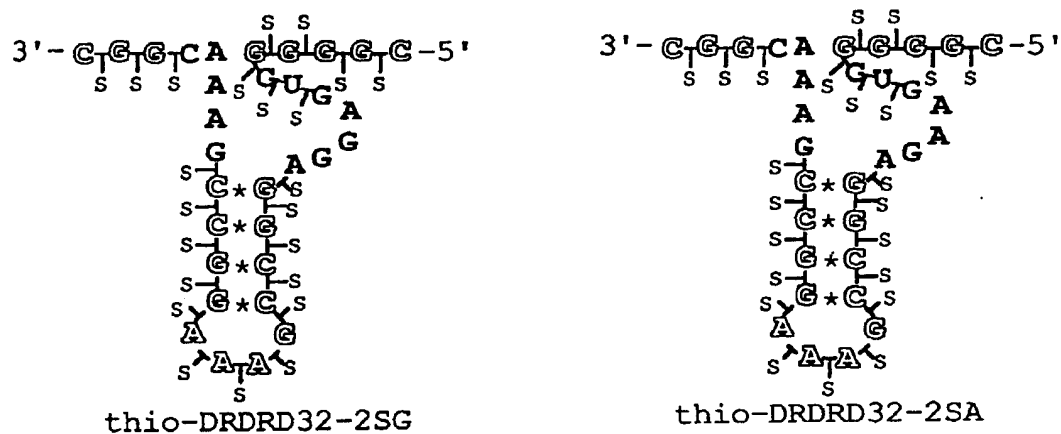
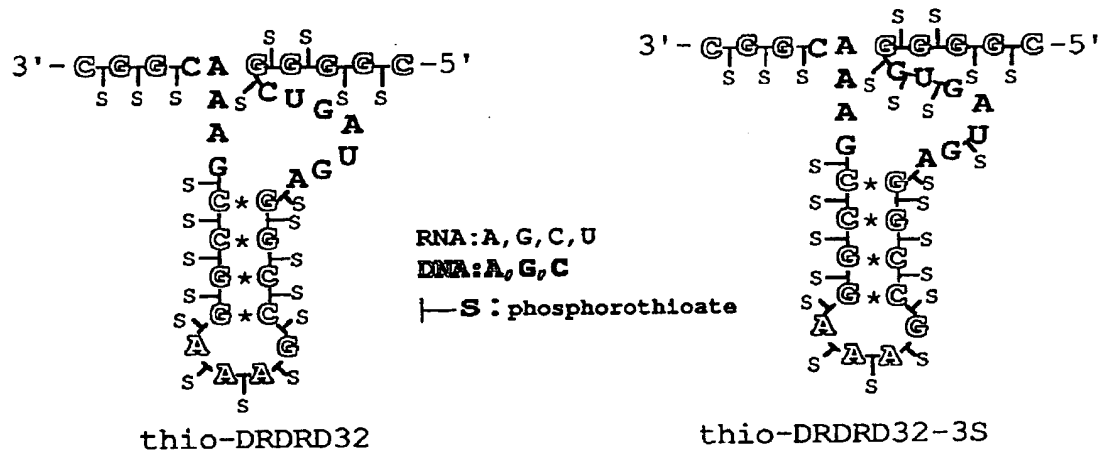
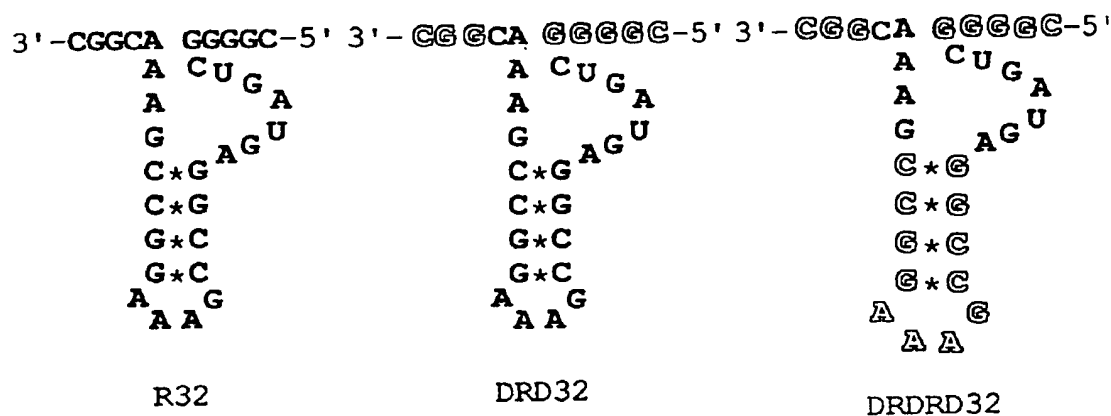


図5 キメラリボザイム

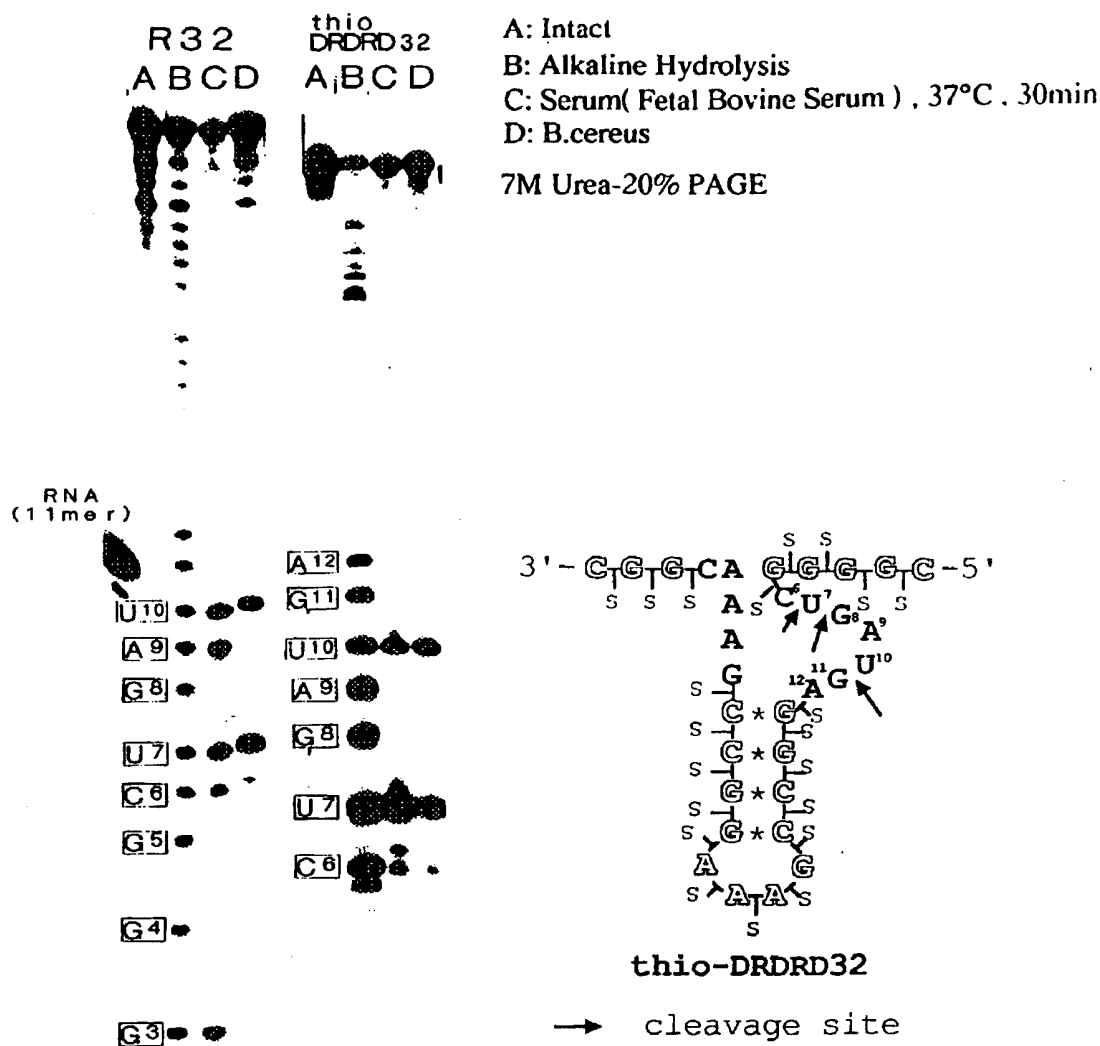


図6 種々のリボヌクレアーゼによる野生型及びキメラリボザイムの分解

欠であるが、我々が行っている分子軌道計算<sup>17-28)</sup>の結果、この  $Mg^{2+}$  は RNA 切断反応を促進させる事実上の触媒であり、リボザイムの RNA 成分は単にマグネシウム・イオンの足場を提供しているにすぎないという可能性がでてきた。とすると、DNA によるリボザイムの修飾により  $Mg^{2+}$  がよりよく遷移状態を安定化するような構造の変化が起こっていると考えられる。また、分子軌道計算の結果を生かし、新しいより高機能なリボザイムを創製することも夢ではなくなってきた。

##### 5. 新しいリボザイム —HDV リボザイムの機能構造の探索—

ヒトデルタ肝炎ウイルス(HDV)はB型肝炎ウイルスが感染している細胞に特異的に感染するサテライトウイルスである。その遺伝子は一本鎖の環状RNAで約1700Ntsからなる。ハンマーヘッド型リボザイムの起源である植物のウイロソイドとよく似ており、ローリングサークル型の様式で複製し分子内で自己切断反応により1ユニットごとになることが明かにされている。その切断様式はハンマーヘッド

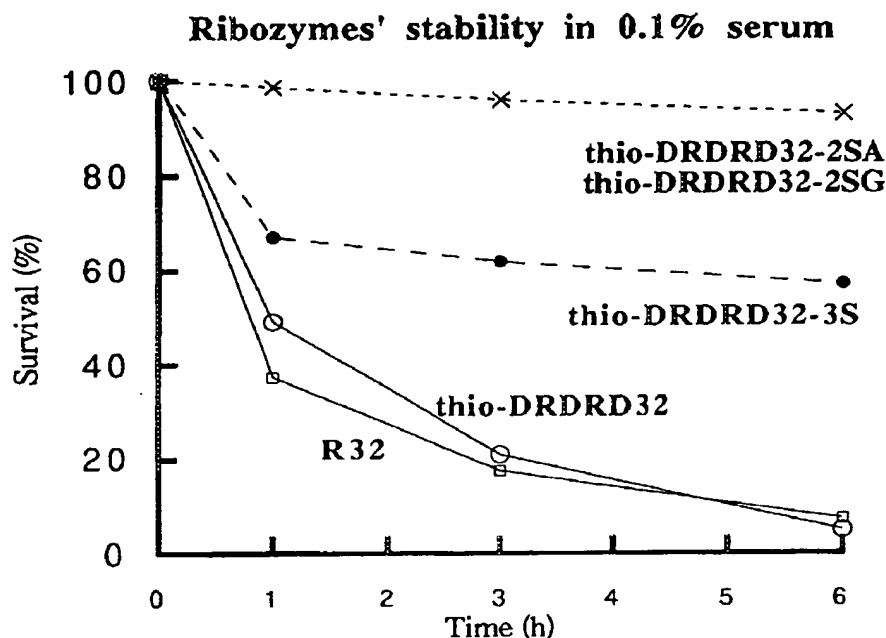


図7 化学合成リボザイムのウシ胎児血清中での安定性

型リボザイムと同じく、 $Mg^{2+}$ 存在下に、2', 3'環状リン酸体を生成する<sup>29)</sup>。その後、自己切断反応に必要な領域は133Ntsまでせめられたが<sup>30)</sup>、このHDVリボザイムはハンマーヘッド型リボザイムやその次に発見されたヘアピン型リボザイムとは、切断点近傍の塩基配列やさらには2次構造にも共通性が見いだされない。ハンマーヘッド型リボザイムの必須残基や2次構造はすで明らかであるが、これと同じ反応を触媒するHDVリボザイムの機能構造がどのようなものかは興味深く、またホ乳類由来のはじめてのリボザイムでもあり、その応用面にも興味もたれた。

そこでこの分子をもとに種々の、特に内部部分の欠失変異体を作り、どこまで欠失できるかを調べた<sup>11)</sup>。図8Aに最初にもとにしたHDV133(654-786)の2次構造とその両端からけずり込んだHDV88(683-770)と、さらに内部の欠失した領域を示す。またそれらの切断活性を表1に示す。この結果、HDV133より両端から短くしたHDV88のほうが活性の高いこと、また、HDV133ならびにその変異体では尿素を加えて、部分変性したほうが活性の高いことがわかる。このことは活性型のコンホメーションは図8Aのような最安定なステム・ループ構造ではないことを示唆している。また、HDV133とHDV88の2つの分子を比較すると、DI-3を欠失したものはいずれの分子でも活性がある。ところが、DI-1を欠失した場合、HDV133では活性があるにもかかわらず、HDV88では全くない。このことはHDV133とHDV88で、活性あるコンホメーションを作るのに必要な補足因子がそれぞれ異なることを示している。

これらの欠失変異体を解析している途中でいくつかの2次構造モデルが報告されてきた(図8B,C)。pseudoknot型<sup>12)</sup>(偽結び型)、axehead型<sup>31)</sup>(斧型)である。DI-1からDI-4までの部分を同じ模様で表すと、DI-3、DI-4はどのモデルでもステム・ループ構造をとっているが、DI-1、DI-2が各モデルで異なっている。一方、リボザイムの触媒機能には一本鎖ループ部分の残基が関与していることがハンマーヘッド型やヘアピン型リボザイムの研究から明らかである。リボザイムではそのループ部分

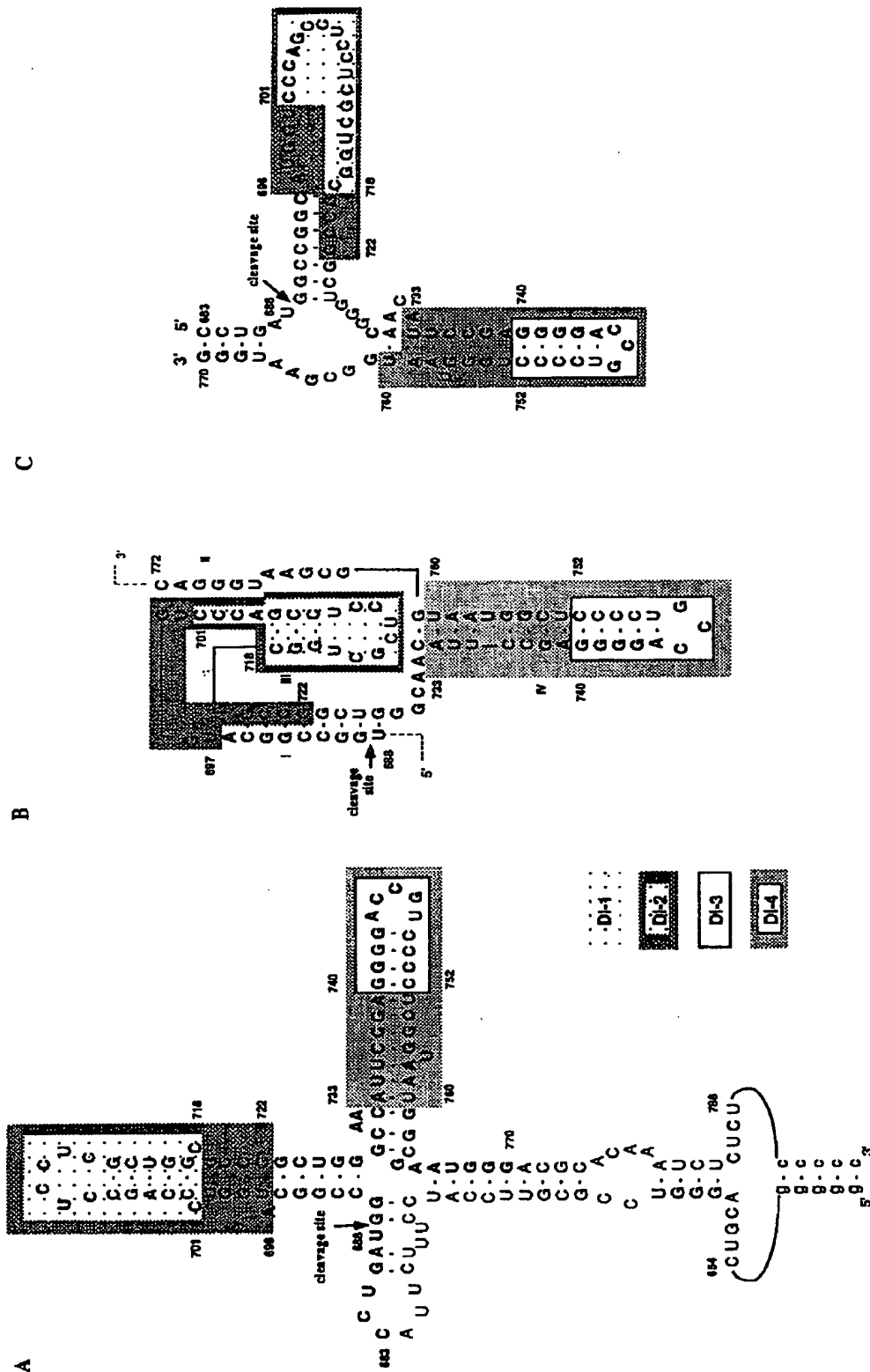


図8 HDV リボザイム。A. HDV133(654-786)の2次構造モデル。HDV88(683-770)はゴチック体で表す。DI-1~DI-4は欠失部分を表す。B. Pseudoknot 型の2次構造モデル。C. Axehead 型の2次構造モデル

表1 HDV リボザイムの種々の欠失変異体の切断活性 HDV133の活性を100とした時の値で表示。

Name	Genomic No.	Gleavege Activity (relative %)
HDV 133	654-786	100/155*
DI 1	D (701-718)	45/55*
DI 2	D (696-722)	0
DI 3	D (740-752)	20/65*
HDV 88	683-770	1000
88 DI 1	D (701-718)	0
88 DI 2	D (696-722)	0
88 DI 3	D (740-752)	160
88 DI 4	D (733-760)	0

\*は4.5M 尿素存在下での活性。

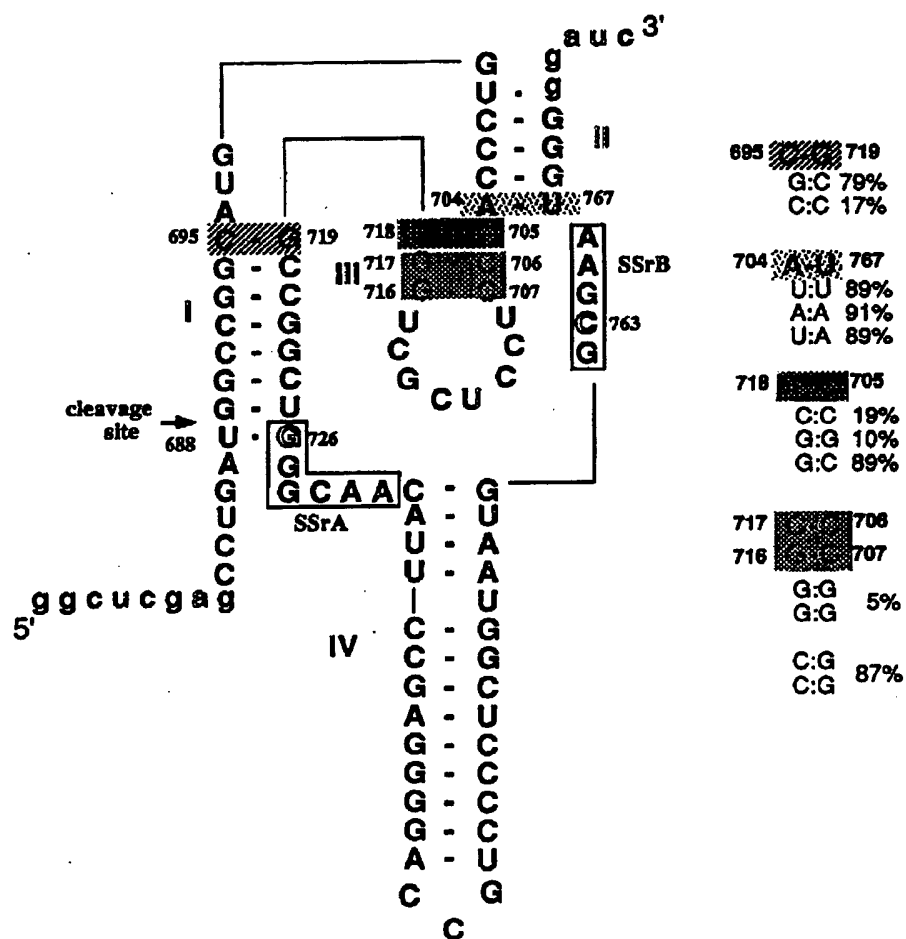


図9 HDV リボザイム変異体と活性

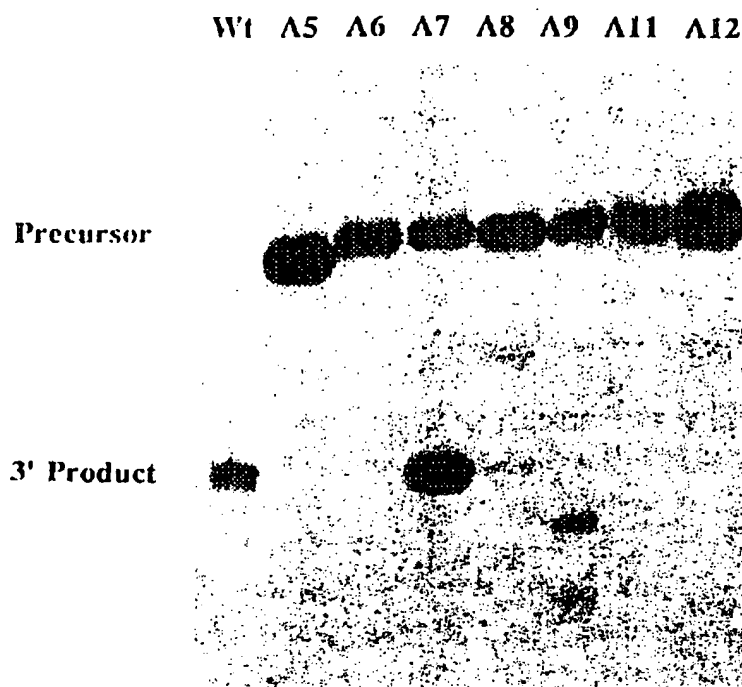


図10 HDV リボザイムの種々の変異体の転写-切断反応連続システムの産物のポリアクリルアミドゲル電気泳動パターン

に保持された  $Mg^{2+}$  イオンが実際の切断反応を触媒しているのだろう<sup>22,23,25</sup>。そこで HDV 型においても SSrA と SSrB (図 9) の 2 ヶ所に的を絞り、その中から重要な残基を探索するためにランダムに変異を導入した。得られた形質変換体からプラスミド DNA を回収し、これをテンプレートに  $[^{32}P]$  RNA 転写産物を調製した。これをポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べると、図10のように wt に比べほとんど切断活性のない変異体を得られて来た。このように転写-自己切断反応の連続システムにより活性著しく低下した変異体のみをピックアップし、それらの DNA シーケンスを調べた結果、いくつかの重要な残基を見いだすことができた(図 9)<sup>32,33</sup>。とくに SSrA 領域の G726 と SSrB 領域の C763 は他の塩基に置換するとほとんど失活することがわかった。HDV リボザイムでは活性に必須の残基がどれかもわからない状態であったが、このようにたくさんの変異体を作り、それらの活性を測ることで重要な残基を特定することができた。

一方、高次構造に対する情報も得られてきた。先にも少し触れたが、ステムⅣ(pseudoknot モデル)の構造はどのモデルでも共通である。そこで残りのステムⅠ, Ⅱ, Ⅲ部分に変異をいれ、ステム構造の重要性を検討した。図 9 に変異体の種類と活性を示す。ステムⅠ, Ⅱではワトソン・クリック塩基対を欠くと活性が低下するが、塩基対が組めるようにすると活性がもどる。このことはこれらの領域のステム構造が非常に重要であることを示している<sup>34</sup>。一方、ステムⅡの塩基対は活性にはそれほど重要でないことがわかった。ステムⅢの重要性を指摘したのははじめてで、これらの結果は pseudoknot 構造を支持している。更に、これら変異体の RNase 限定分解パターンや UV クロスリンクによる実験から高次構造に対する情報が得られるものと期待している。

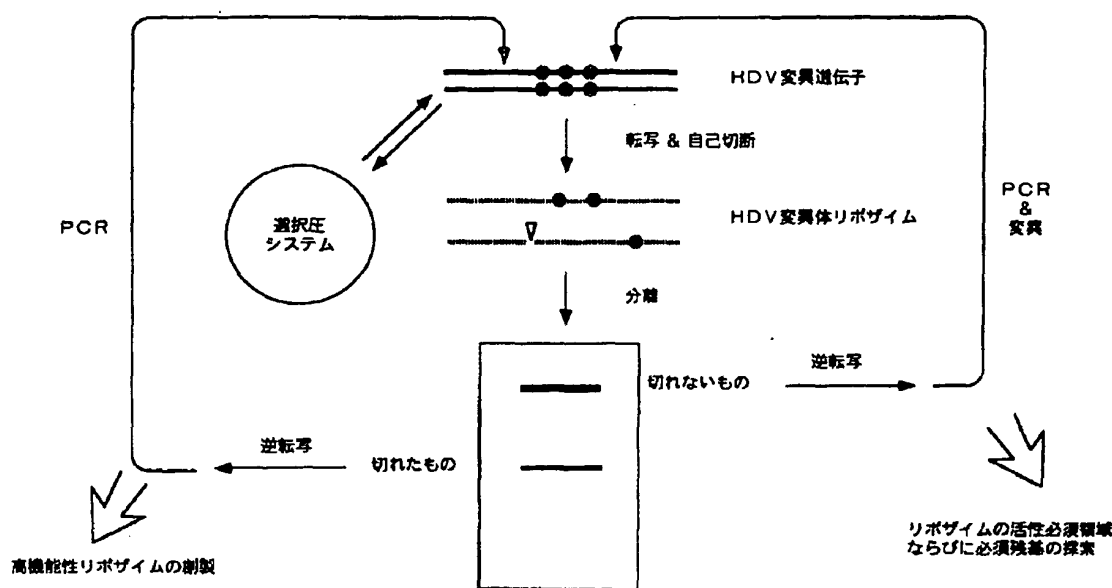


図11 リボザイムエンジニアリングの概念図

## 6. リボザイム研究の新しい展開 —リボザイムエンジニアリング—

最近、試験管内で核酸の進化を行なうことが可能となってきた。この手法は SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)<sup>35)</sup> と呼ばれている。このいわゆる分子進化を模したストラテジーはライブラリーに含まれる無数の分子から、目的の分子のみを選択し、更にそれを増やし濃縮しようとするものである。この SELEX のシステムが最近、リボザイムの研究にも取り入れられてきた<sup>36,37)</sup>。われわれも図11のように HDV リボザイムをモデルにその他の必須残基の探索や高機能性リボザイムの開発をめざしている。

## 7. おわりに

10年前に見つかった RNA 鎖を自分自身で切断するリボザイムはここで紹介したように、その反応と構造との関係に対する興味と応用への期待に包まれて研究が進められてきた。特にこの数年その傾向が著しい。一方でこの 1, 2 年の間に新たな機能を持つ RNA が見つかり、RNA 研究に新しい局面を迎えつつある。例えば、mRNA のスプライシング反応が実際にはスプライソゾームの RNA 成分によっておこなわれていたり<sup>38)</sup>、mRNA ができ上がった後に起こるヌクレオチドの付加反応(RNA エディティング)が RNA 自身による反応であったり<sup>39)</sup>、さらにはリボゾーム上で行われるタンパク質合成さえもが rRNA により触媒されていることが示され<sup>40)</sup>、まさに生命の起源は“RNA”からという RNA ワールドが一層、実味を帯びてきた。リボザイムをはじめとする RNA の構造と機能の研究はまさに目が離せないところである。

最後に、紙面の都合上割愛した領域にも興味をお持ちの方は、最近書いた総説<sup>41-59)</sup>も参考にさせていただきたい。また、ここで紹介した結果は次の方々との共同研究によるものであることを付記し、この場をかりて感謝いたします。大川 淳(長瀬産業)、湯山則子(茨城大学)、安田香央里(ミリポア)、嶋山

隆(日立化成), 澤田慎矢(筑波大学), 高木康臣(筑波大学), 和田 晃(久光製薬), Penmetcha K.R. Kumar (STA フェロー), Young-Ah Suh (STA フェロー), 川上純司(北海道大学), 宮代博継(科技厅特別研究員), 西川富美子, 荻野英子。

## 文 献

- 1) Cech, T. R. (1990) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **29**, 759-768.
- 2) Uhlenbeck, O.C. (1987) *Nature* **328**, 596-600.
- 3) Haseloff, J. and Gerlach, W.L. (1988) *Nature* **334**, 585-591.
- 4) Taira, K. and Nishikawa, S. (1992) In "Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA" (Erickson, R. P. and Izant, J. G., Eds.) Raven Press, New York, pp35-54.
- 5) Taira, K., Oda, M., Shinshi, H., Maeda, H., and Furukawa, K. (1990) *Protein Engineering* **3**, 733-737.
- 6) Taira, K., Nakagawa, K., Nishikawa, S., and Furukawa, K. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 5125-5130.
- 7) Nakagawa, K. and Taira, K. (1991) *Kemia-Kemi* **18**, 1032-1059.
- 8) Yuyama, N., Ohkawa, J., Inokuchi, Y., Shirai, M., Sato, A., Nishikawa, S., and Taira, K. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 1271-1279.
- 9) Ohkawa, J. et al., manuscript in preparation.
- 10) Nagai, K., personal communication.
- 11) Suh, Y.-A., Kumar, P. K. R., Nishikawa, F., Kayano, E., Nakai, S., Odai, O., Uesugi, S., Taira, K., and Nishikawa, S. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 747-753.
- 12) Perrotta, A.T. and Been, M. D. (1991) *Nature* **350**, 434-436.
- 13) Sarver, N., Cantin, E. M., Chang, P. S., Zaia, J. A., Ladne, P. A., Stephens, D. A., and Rossi, J. J. (1990) *Science* **247**, 1222-1225.
- 14) Taira, K., Miyashiro, H., Tanaka, M., Kimura, T., Shinshi, H., Yoshida, Y., Yoneyama, N., Kayano, E., Nishikawa, F., and Nishikawa, S. (1991) *J. Cellular Biochem.* **15D**, 21.
- 15) Shimayama, T., Sawata, S., T. and Taira, K., submitted for publication.
- 16) Shimayama, T., et al., manuscript in preparation.
- 17) Taira, K., Uebayasi, M., and Furukawa, K. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 3699-3708.
- 18) Taira, K., Uebayasi, M., Maeda, H., and Furukawa, K. (1990) *Protein Engineering* **3**, 691-701.
- 19) Taira, K., Uchimarui, T., Tanabe, K., Uebayasi, M., and Nishikawa, S. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 2747-2753.
- 20) Uchimarui, T., Tanabe, K., Nishikawa, S., and Taira, K. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 4351-4353.
- 21) Storer, J. W., Uchimarui, T., Tanabe, K., Uebayasi, M., Nishikawa, S., and Taira, K. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 5216-5219.
- 22) Uchimarui, T., Tanabe, K., Uebayasi, M., and Taira, K. (1992) *Chem. Express* **7**, 501-504.
- 23) Uebayasi, M., Uchimarui, T., and Taira, K. (1992) *Chem. Express* **7**, 617-620.
- 24) Uchimarui, T., Storer, J. W., Tanabe, K., Uebayasi, M., Nishikawa, S., and Taira, K. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 1523-1528.
- 25) Uchimarui, T., Uebayasi, M., Tanabe, K., and Taira, K., *FASEB J.*, in press.
- 26) Yliniemela, A., Uchimarui, T., Tanabe, K., and Taira, K., *J. Am. chem. Soc.*, in press.
- 27) Taira, K., Uchimarui, T., Storer, J. W., Uebayasi, M., and Tanabe, K., submitted for publication.



- 28) Uchimarui, T., Storer, J. W., Tsuzuki, S., Tanabe, K., and Taira, K., submitted for publication.
- 29) Nishikawa, S., Nakagawa, K., Kimura, T., Tanaka, M., Yuyama, N., Shimayama, T., Ohkawa, J., Inokuchi, Y., Miyashiro, H., Maeda, H., Furukawa, K., and Taira, K. (1991) In "Fundamental Investigations on the Creation of Biofunctional Materials", (Okamura, S., Tsuruta, T., Imanishi, Y., and Sunamoto, J., Eds.) Kagaku-Dojin, Kyoto, pp109-123.
- 30) Wu, H.-N., Lin, Y.-J., Lin, F.-P., Makino, S., Chang, M.-F., Lai, M. M. C. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1831-1835.
- 31) Branch, A. D. and Robertson, H. D. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10163-10167.
- 32) Kumar, P.K.R., Suh, Y.-A., Miyashiro, H., Nishikawa, F., Kawakami, J., Taira, K., and Nishikawa, S. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 3919-3924.
- 33) Suh, Y.-A., et al., submitted for publication.
- 34) Kumar, P.K.R., Suh, Y.-A., Taira, K., and Nishikawa, S. (1993) *FASEB J.*, in press.
- 35) Tuerk, C. and Gold, L. (1990) *Science* **254**, 1361-1364.
- 36) Pan, T. and Uhlenbeck, O. C. (1992) *Biochemistry* **31**, 3887-3895.
- 37) Herrantz, A. B., Joseph, S., and Burke, J. M. (1992) *Genes & Development* **6**, 129-134.
- 38) Sawa, H. and Shimura, Y. (1992) *Genes & Develop.* **6**, 244-254.
- 39) Bulm, B., Sturm, N. R., Simpson, A. M., and Simpson, L. (1991) *Cell* **65**, 543-550.
- 40) Noller, H. F., Hoffarth, V., and Zimniak, L. (1992) *Science* **256**, 1416-1419.
- 41) 多比良和誠(1990)電子情報通信学会誌 **73**, 316-325.
- 42) 多比良和誠, 西川 諭(1991)バイオトレンド(丸善), **3-1**, 96-106.
- 43) 中川香央里, 多比良和誠(1991) *BIOMedica* **6**, 1331-1336.
- 44) 嶋山 隆, 多比良和誠(1992) *BIOMedica* **7**, 89-94.
- 45) 井口義夫, 多比良和誠(1992) *BIOMedica* **7**, 428-432.
- 46) 川上純司, 西川 諭(1992)化学と生物 **30**, 244-248.
- 47) 川上純司, 西川 諭, 多比良和誠(1992) *Pharm Tech Japan* **8**, 247-264.
- 48) 川上純司, 嶋山 隆, 大川 淳, 湯山則子, 安田香央里, 内丸忠文, 上林正巳, 西川富美子, 西川 諭, 多比良和誠(1992) *Pharm Tech Japan* **8**, 395-411.
- 49) 大川 淳, 川上純司, 湯山則子, 安田香央里, 嶋山 隆, 西川富美子, 井口義夫, 武部 豊, 西川 諭, 多比良和誠(1992) *Pharm Tech Japan* **8**, 491-512.
- 50) 多比良和誠(1992)生物物理 **32**, 128-134.
- 51) 多比良和誠(1992)遺伝 **46(9)**, 4-5.
- 52) 多比良和誠(1992)工業技術 **33(8)**, 38-44.
- 53) 大川 淳, 多比良和誠(1992) *BIOMedica* **7**, 1007-1012.
- 54) 多比良和誠(1992)医学のあゆみ **162**, 919-922.
- 55) 湯山則子, 大川 淳, 多比良和誠(1992) *BIOMedica* **7**, 1318-1322.
- 56) 川上純司, 多比良和誠, *BIOMedica*, 印刷中.
- 57) 西川 諭, 多比良和誠, 新生化学実験講座: 第13巻バイオテクノロジー(東京化学同人), 印刷中.
- 58) 多比良和誠, 化学工業, 印刷中.
- 59) 多比良和誠, 細胞工学, 印刷中.